

## *Tetramethylbenzidine (TMB)*

1. Dissolver 0,1 mg de 3',3',5',5'-tetramethylbenzidine (TMB) em 0,1 ml de dimethylsulfoxide. Adicionar 9,9 ml de 0,1 M de Acetato de Sódio (pH 6,0). Filtrar em filtro Whatman No. 1 ou equivalente. Adicionar peróxido de hidrogênio para uma concentração final de 0,01%. Isto é suficiente para duas placas de 96 poços. (Peróxido de hidrogênio é normalmente fornecido em uma solução 30%. Após aberto, ele pode ser armazenado a 4°C, onde permanece estável por 1 mês).
2. Após a lavagem final com PBS, adicione 50 µl da solução de substrato para cada poço da placa. Os positivos aparecem em azul.
3. Incube por 10-30 minutos a temperatura ambiente. Os positivos aparecem agora em amarelo.
4. Adicione 50 µl da solução de parada, 1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ou 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), para cada poço. Para quantificar a ligação, leia os resultados a 450 nm.